

SINERGISME FRAKSI ETIL ASETAT LENGKUAS DENGAN FRAKSI ETIL ASETAT LIDAH BUAYA, KULIT BATANG KRANGEAN, DAUN SEMBUNG, DAN BIJI KOPI TERHADAP SEL T47D



**Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I pada Jurusan Farmasi
Fakultas Farmasi**

Oleh:

RIA ARISTANTIKA

K 100 150 117

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
2019**

HALAMAN PERSETUJUAN

SINERGISME FRAKSI ETIL ASETAT LENGKUAS DENGAN FRAKSI ETIL ASETAT LIDAH BUAYA, KULIT BATANG KRANGEAN, DAUN SEMBUNG, DAN BIJI KOPI TERHADAP SEL T47D

PUBLIKASI ILMIAH

oleh:

RIA ARISTANTIKA

K 100 150 117

1 diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Dosen Pembimbing



Azis Saifudin, Ph.D., Apt.

NIK.956

HALAMAN PENGESAHAN

RUJUKAN FRAKSI ETIL ASETAT LENGKUAS DENGAN FRAKSI ETIL ASETAT LIDAH BUAYA, KULIT BATANG KRANGEAN, DAUN SEMBUNG, DAN BIJI KOPI TERHADAP SEL T47D

OLEH

RIA ARISTANTIKA

K 100 150 117

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji
Fakultas Farmasi
Universitas Muhammadiyah Surakarta
Pada hari 15, Maret, 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dewan Penguji:

1. Maryati Ph.D., Apt.
(Ketua Dewan Penguji)
2. Cita Hanif Muflihah, M.,Sc., Apt
(Anggota I Dewan Penguji)
3. Azis Saifudin, Ph.D., Apt.
(Anggota II Dewan Penguji)

(.....)
(.....)
(.....)

Dekan,



PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam naskah publikasi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

Surakarta, 10 Maret 2019

Penulis



RIA ARISTANTIKA

K 100 150 117

SINERGISME FRAKSI ETIL ASETAT LENGKUAS DENGAN FRAKSI ETIL ASETAT LIDAH BUAYA, KULIT BATANG KRANGEAN, DAUN SEMBUNG, DAN BIJI KOPI TERHADAP SEL T47D

Abstrak

Kanker menempati urutan pertama penyebab kematian di seluruh dunia, salah satu jenis kanker dengan angka kematian tertinggi pada wanita adalah kanker payudara. Lengkuas (*Alpinia galanga*) merupakan salah satu tanaman yang diketahui memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Tanaman lain yang juga diketahui memiliki aktivitas sitotoksik yaitu lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm. f.), kulit batang krangan (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers), daun sembung (*Blumea balsamifera* L.), dan biji kopi (*Coffea* L.). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui adanya efek sinergisme fraksi etil asetat keempat tanaman tersebut terhadap aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat lengkuas pada sel T47D. Siplisia tanaman dimaserasi menggunakan metanol, kemudian difraksinasi menggunakan etil asetat:air (1:1). Metode yang digunakan pada uji sitotoksik adalah MTT assay. Kontrol positif yang digunakan adalah doxorubisin. Efek sinergisme dilihat berdasarkan nilai IC_{50} sampel lengkuas tunggal dan kombinasi. Hasil nilai IC_{50} yang diperoleh untuk sampel lengkuas tunggal yaitu 53,735 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan nilai IC_{50} sampel kombinasi terendah yaitu 74,764 $\mu\text{g/mL}$ (kombinasi lengkuas-daun sembung). Kesimpulan dari penelitian yang dilakukan yaitu fraksi etil asetat lidah buaya, kulit batang krangan, daun sembung, dan biji kopi tidak memiliki efek sinergisme terhadap aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat lengkuas pada sel T47D.

Kata Kunci: sinergisme, lengkuas, MTT, T47D.

Abstract

Cancer ranks the first cause of death worldwide, one type of cancer with the highest mortality rate in women is breast cancer. Laos (*Alpinia galanga*) is one of the plants known to have cytotoxic activity against cancer cells. Other plants that are also known to have cytotoxic activity are aloe vera (*Aloe vera* (L.) Burm. F.), krangan bark (*Litsea cubeba* (Lour.) Press), sembung leaves (*Blumea balsamifera* L.), and coffee beans (*Coffea* L.). The purpose of this study was to determine the synergistic effect of the four ethyl acetate fractions of the plants on their cytotoxic activity towards ethyl acetate fractions of laos in T47D cells. The simplisia of plants are macerated with methanol, and then fractionated using ethyl acetate:water (1:1). The method used in the cytotoxic test was MTT assay. The positive control used was doxorubicin. The synergistic effect was determined based on the IC_{50} value of single and combination laos samples. The IC_{50} obtained for single laos sample was 53.735 $\mu\text{g/mL}$, while the lowest IC_{50} value combination sample was 74.764 $\mu\text{g/mL}$ (combination of laos-sembung leaf). The conclusion of this research is that ethyl acetate fraction of aloe vera, krangan bark, sembung leaf, and coffee beans did not have synergistic effect with ethyl acetate fraction of laos upon its cytotoxic activity against T47D cells.

.Keywords: synergistic, lengkuas, MTT, T47D.

1. PENDAHULUAN

Menurut data Kemenkes RI Penyakit kanker menempati urutan pertama penyebab kematian di seluruh dunia. Hasil survey *World Health Organization* (WHO) tahun 2014 menunjukkan dari 92.200 pasien yang meninggal karena kanker, sebesar 21,4% disebabkan oleh kanker payudara pada wanita. Pengobatan yang ada dapat dikatakan belum efektif karena obat yang digunakan tidak spesifik terhadap sel kanker, sehingga dapat mempengaruhi sel normal lainnya dan menimbulkan beberapa efek samping seperti rambut rontok, mual dan muntah (Susan, 2009).

Penemuan alternatif pengobatan penyakit kanker yang lebih efektif sangat diperlukan. Salah satu cara yang dapat dilakukan yaitu dengan menggunakan obat herbal. Penggunaan obat herbal direkomendasikan oleh *World Health Organization* (WHO), serta penelitian dan pengembangan tanaman obat sangat dianjurkan oleh Kemenkes RI, karena kandungan senyawa obat herbal lebih beragam dan beberapa tanaman dapat memiliki efek sinergisme. Selain itu, efek samping yang ditimbulkan dari obat herbal relatif rendah (Ningsih, 2016).

Beberapa tanaman yang diketahui memiliki aktivitas sitotoksik yaitu lengkuas (*Alpinia galanga*), lidah buaya (*Aloe vera* (L.) Burm. f.), kulit batang kragean (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers), daun sembung (*Blumea balsamifera* L.), dan biji kopi (*Coffea* L.). Hidayati (2018) melakukan pengujian aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat lengkuas (*Alpinia galanga*) yang berasal dari Boyolali terhadap sel T47D dan memperoleh nilai IC_{50} sebesar 52,17 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian terkait fraksi etil asetat lidah buaya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dilakukan oleh Prahesti *et al.*, (2015) dengan nilai LC_{50} sebesar 56,48 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak etil asetat kulit batang kragean memiliki nilai IC_{50} pada sel T47D sebesar 71,23 $\mu\text{g/mL}$ (Dalimunthe *et al.*, 2017). Hasegawa *et al.*, (2006) menyebutkan daun sembung mengandung senyawa *dihydroflavonol* yang aktif sebagai antitumor. Berdasarkan penelitian Saewan *et al.*, (2011) kandungan sembilan senyawa flavonoid fraksi etil asetat daun sembung aktif terhadap sel kanker paru-paru NCI-H187 dengan nilai IC_{50} yang berbeda-beda pada tiap senyawa. Menurut Farhaty and Muchtaridi (2014) kopi banyak mengandung asam klorogenat dengan kadar 8% pada biji kopi murni dan 4,5% pada kopi sangrai.

Sinergisme adalah keberadaan senyawa adjuvan yang dapat meningkatkan suatu efek jika dikombinasikan dan efek menjadi lemah jika beraksi tunggal (Saifudin, 2014). Penelitian terkait sinergisme aktivitas sitotoksik pada sel T47D dilakukan oleh Fauzia *et al.*, (2017) yang mengkombinasikan ekstrak metanol daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) dengan doksorubisin. Hasil yang diperoleh dari penelitian tersebut menunjukkan adanya efek sinergisme dengan nilai *Combination Index* (CI) sebesar 0,50. Penelitian lainya yaitu menguji aktivitas sitotoksik kombinasi ekstrak etanol daun leunca (*Solanum nigrum* L.) dengan doksorubisin pada sel T47D dan

menghasilkan nilai *Combination Index* (CI) sebesar 0,59 yang termasuk dalam kategori sinergis (Anindjayati *et al.*, 2010).

Pada penelitian ini, diharapkan fraksi etil asetat lidah buaya, kulit batang kragean, daun sembung dan biji kopi mengandung senyawa aktif yang dapat memberikan efek sinergisme terhadap aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat laos pada sel T47D, sehingga dapat dijadikan alternatif pengobatan yang lebih efektif terhadap penyakit kanker terutama kanker payudara pada wanita

2. METODE

2.1 Alat

Alat gelas (Pyrex), lemari pengering (Autonic), bejana maserasi, timbangan analitik (Precisa dan Ohaus), *rotary evaporator* (Heidolph), lemari asam, mikropipet (Socorex), vortex (Thermolyne), mikroskop (Olympus CKX41), *haemocytometer* (Assistent), *coulter counter*, *cytotoxic safety cabinet* (Isocide), *ELISA reader* (Elx800 Bio Tech), inkubator CO₂ 5% (Binder), *plate* 96 (Iwaki), *low vacuum* (GEA Medical), *vacum Buchner*, tabung konikal steril, optilab (Miconos).

2.2 Bahan

Rimpang lengkuas didapatkan dari Boyolali. Lidah buaya, kulit batang kragean, dan daun sembung didapatkan dari daerah Solo Raya dalam bentuk simplisia kecuali lidah buaya. Biji kopi didapatkan dari daerah Merangin Jambi. Bahan lainnya yaitu sel T47D, metanol, etil asetat, media kultur *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 yang dilengkapi dengan antibiotik Penisilin-Streptomisin 1% serta *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%. Selain itu, digunakan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) 0,1%, reagen *Microculture Tetrazolium Salt* (MTT) 0,5%, *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) 10% dalam HCl 0,01 N, *Phospate Buffer Saline* (PBS), alumunium foil, tripsin-EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*), *yellow tips*, *blue tips* dan doksorubisin 2%.

2.3 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Farmakologi, dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi bahan dan Pembuatan ekstrak

Bahan yang telah dicuci bersih dan dipotong-potong kemudian dikeringkan dalam almari pengering selama 3 hari. Sebanyak ± 100 gram simplisia dimaserasi menggunakan metanol 10x

bobot simplisia selama 3 hari di dalam bejana maserasi dan disertai pengadukan 1x setiap hari. Penguapan pelarut dilakukan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 64,7 °C.

Ekstrak metanol difraksinasi cair-cair menggunakan etil asetat:air (1:1) untuk tiap gram ekstrak. Dilakukan pengocokan selama 5 menit, kemudian didiamkan selama 30 menit agar terjadi pemisahan antar pelarut. Lapisan bawah (air) dibuang, sedangkan lapisan atas (etil asetat) diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 77,1 °C. Hasil fraksi diletakkan pada lemari asam untuk menguapkan pelarut yang masih tersisa. Sampel yang digunakan untuk uji sitotoksik adalah fraksi etil asetat dari masing-masing tanaman.

Larutan stok 1% untuk tiap sampel dibuat dengan melarutkan 10 mg fraksi etil asetat masing-masing tanaman dalam 100 µL DMSO dan 900 µL media RPMI. Seri konsentrasi sampel yang digunakan yaitu 25; 50; 100; 200; dan 400 µg/mL. Sampel tunggal masing-masing tanaman konsentrasi 400 µg/mL dibuat dengan melarutkan 40 µL dari larutan stok dalam media RPMI hingga 1 mL kemudian dilakukan pengenceran bertingkat untuk konsentrasi lainnya. Sedangkan untuk sampel kombinasi konsentrasi 400 µg/mL dibuat dengan melarutkan 20 µL dari larutan stok lengkuas dan 20 µL dari larutan stok tanaman lain dalam media RPMI hingga 1 mL kemudian dilakukan pengenceran.

2.4.2 Pemanenan dan perhitungan sel T47D

Sel T47D dalam inkubator CO₂ dipanen saat kondisi 80% konfluen. Media di dalam *tissue culture flask* dibuang menggunakan *low vacuum*, sel dicuci dengan PBS sebanyak 5 mL. Ditambahkan secara merata 450 µL tripsin-EDTA untuk melepaskan ikatan antar sel dan ikatan sel dengan matrik *tissue flask culture* tanpa merusak sel, kemudian *plate* 96 diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% selama 5 menit, lalu ditambahkan ±5 ml media untuk menginaktifkan tripsin. Sel diresuspensi menggunakan mikropipet sampai terpisah satu sama lain yang diamati menggunakan mikroskop dan ditransfer ke dalam tabung konikal steril yang baru. Perhitungan sel dilakukan dengan meresuspensikan sel hasil panen kemudian diambil sebanyak 10 µL menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *haemocytometer*. Sel diamati di bawah mikroskop dan dihitung menggunakan *Coulter counter*.

Cara perhitungan jumlah sel:

$$\frac{\text{Jumlah sel bilik A} + \text{B} + \text{C} + \text{D}}{4} \times 10^4$$

Jumlah kepadatan sel yang diinginkan yaitu 10⁴ sel tiap sumuran.

Perhitungan pengenceran sel:

$$\frac{\text{Kepadatan yang diinginkan} \times \text{jumlah sumuran}}{\text{sel hasil hitung}}$$

2.4.3 Uji sitotoksik MTT assay

Tiap sumuran dalam *plate* 96 diisi dengan 100 µL sel T47D hasil panen dengan kepadatan 10^4 sel, disisakan 3 sumuran kosong untuk kontrol media, kemudian *plate* 96 diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% selama 48 jam. Media dibuang, lalu dimasukan seri konsentrasi sampel tunggal dan kombinasi ke dalam sumuran sebanyak 100 µL tiap sumuran pada *plate* 96 yang berbeda dan dilakukan 3x replikasi, kemudian *plate* 96 diinkubasi pada inkubator CO₂ 5% selama 24 jam hingga terlihat adanya aktivitas sitotoksik dari masing-masing sampel. Reagen MTT 0,5% ditambahkan sebanyak 100 µL pada tiap sumuran setelah media dibuang, *plate* 96 diinkubasi pada inkubator CO₂ selama 2 jam.

Terbentuknya formazan dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x, untuk menghentikan reaksi dilakukan penambahan SDS 10% dalam HCl 0,01 N sebanyak 100 µL tiap sumuran agar formazan melarut. *Plate* 96 dibungkus menggunakan *aluminium foil*, didiamkan pada suhu kamar dan ditempat gelap selama satu malam. Pembacaan absorbansi dilakukan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 550 nm (CCRC, 2009).

2.4.4 Analisis data

Nilai absorbansi yang dihasilkan digunakan untuk menghitung % sel hidup. Perhitungan dilakukan dengan rumus:

Jika absorbansi kontrol pelarut = kontrol sel

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol sel} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Jika absorbansi kontrol pelarut < kontrol sel

$$\% \text{ Sel hidup} = \frac{\text{Absorbansi perlakuan} - \text{Absorbansi kontrol media}}{\text{Absorbansi kontrol pelarut} - \text{Absorbansi kontrol media}} \times 100\%$$

Data % sel hidup dimasukan kedalam regresi linier $Y = Bx + A$, yang digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ kemudian dibuat grafik hubungan antara log konsentrasi vs % sel hidup. Pengaruh perlakuan sampel terhadap pertumbuhan sel dilihat berdasarkan grafik hubungan konsentrasi vs % sel hidup (CCRC, 2009).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi dan Fraksinasi

Maserasi menggunakan pelarut metanol untuk melarutkan senyawa yang belum diketahui strukturnya dan metanol merupakan pelarut pilihan utama untuk mengekstraksi simplisia karena memiliki kemampuan ekstraksi yang luas. Metanol bersifat polar, sehingga beberapa senyawa polar dapat larut dalam metanol seperti senyawa glikosida yang mengikat molekul gula. Selain itu senyawa nonpolar

golongan terpenoid seperti seskuiterpen dan monoterpen masih dapat larut dalam metanol (Saifudin, 2014).

Ekstrak metanol hasil maserasi masih memiliki kandungan senyawa yang sangat kompleks, sehingga perlu dilakukan fraksinasi. Pada umumnya senyawa metabolit sekunder bersifat semipolar, sehingga digunakan pelarut yang bersifat semipolar yaitu etil asetat. Fraksinasi menggunakan etil asetat dapat melarutkan senyawa semipolar seperti terpenoid, fenilpropanoid, dan flavonoid serta beberapa senyawa polar seperti terpenoid terhidroksilasi, glikosida dan polifenol (Saifudin, 2014).

Pemekatan ekstrak dilakukan pada suhu kamar untuk menghindari rusak atau terurainya senyawa aktif akibat panas jika diletakan pada *waterbath*. Rendemen yang dihasilkan dari proses ekstraksi dan fraksinasi berbeda-beda seperti terlihat pada Tabel 1. Rendemen merupakan perbandingan antara bobot ekstrak yang dihasilkan dengan bobot simplisia awal, semakin tinggi nilai rendemen berarti ekstrak yang dihasilkan semakin banyak (Heri *et al.*, 2018).

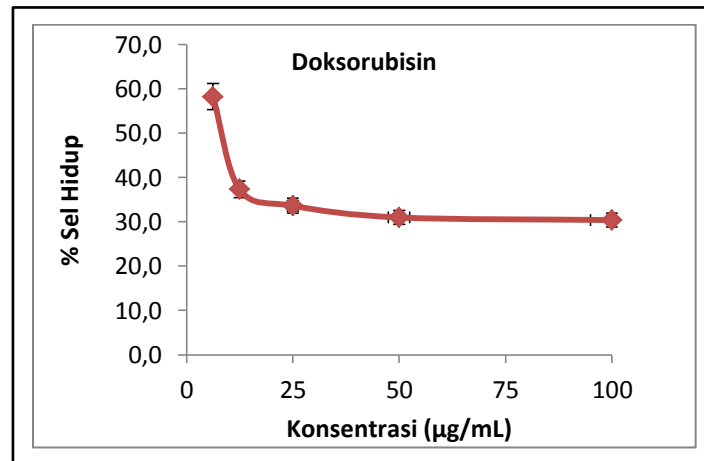
Tabel 1. Hasil rendemen ekstrak metanol dan rendemen fraksi etil asetat

Tanaman	% Rendemen Ekstrak Metanol	% Rendemen Fraksi Etil Asetat
Lengkuas	14,01	4,19
Lidah buaya	22,8	1,47
Kulit batang krangean	14,24	1,33
Daun sembung	14,68	1,63
Biji kopi	40,33	1,81

3.2 Uji Sitotoksik MTT Assay

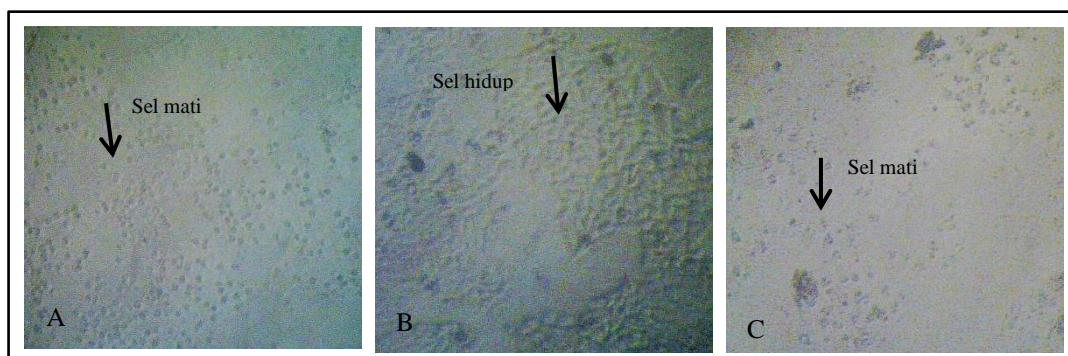
Menurut klasifikasi Q3C DMSO termasuk dalam kelas 3, merupakan kelas pelarut paling aman digunakan. DMSO memiliki aktivitas sitotoksik jika digunakan pada konsentrasi $> 0,5\%$ (Jamalzadeh *et al.*, 2016). DMSO yang digunakan dalam penelitian tidak memiliki aktivitas sitotoksik karena % sel hidup $> 90\%$.

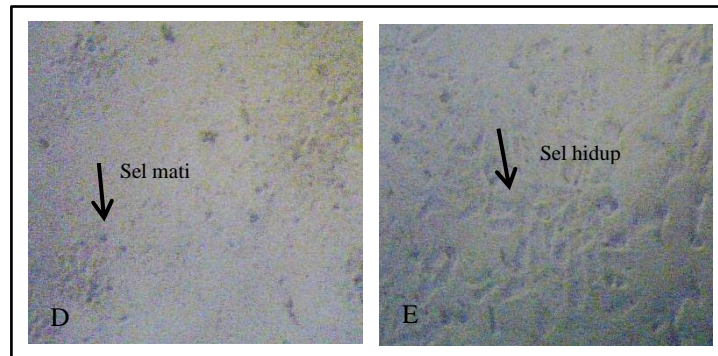
Sel T47D merupakan sel yang sangat cocok digunakan dalam pengujian aktivitas sitotoksik karena sensitif terhadap agen kemoterapi dan memiliki kemampuan replikasi yang sangat cepat (Husni *et al.*, 2015). Sel T47D diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara wanita berumur 54 tahun dan dapat ditumbuhkan dalam media RPMI 1640 + 10% FBS + 1% Penisilin-Streptomisin (ATCC, 2012).



Gambar 1. Pengaruh perlakuan doksorubisin terhadap sel T47D. Terdapat penurunan % sel hidup dengan meningkatnya konsentrasi.

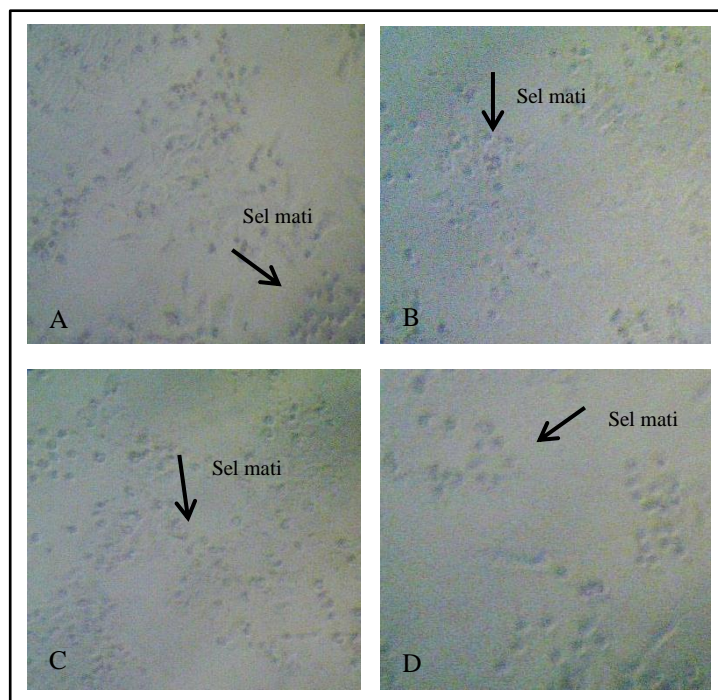
Doksorubisin digunakan sebagai kontrol positif karena sel T47D sensitif terhadap doksorubisin (Aghaee *et al.*, 2013). Doksorubisin merupakan antibiotik golongan antrasiklin yang memiliki dua mekanisme kerja yaitu menginterkalasi DNA dan menghambat enzim topoisomer II. Mekanisme tersebut menyebabkan gangguan pada proses transkripsi dan sintesis DNA sehingga menyebabkan kematian sel (Aghaee *et al.*, 2013). Konsentrasi doksorubisin yang digunakan yaitu 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 µg/mL. Gambar 1 menunjukkan % sel hidup menurun dengan meningkatnya konsentrasi doksorubisin, sehingga dapat dikatakan bahwa kematian sel tergantung dari dosis doksorubisin (*dose dependent response*). Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Susidarti *et al.*, (2014) doksorubisin memiliki IC_{50} 0,02 µg/mL terhadap sel T47D, sedangkan nilai IC_{50} yang diperoleh dari penelitian ini yaitu 6,59 µg/mL. Perbedaan nilai IC_{50} tersebut dapat disebabkan karena perbedaan kepadatan sel dan seri konsentrasi doksorubisin yang digunakan, pada penelitian sebelumnya kepadatan sel 5×10^3 dengan konsentrasi tertinggi 750 µg/mL.





Gambar 2. Morfologi sel T47D diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x setelah perlakuan sampel tunggal. Sel T47D setelah perlakuan sampel lengkuas 50 $\mu\text{g/mL}$ (A), sel T47D setelah perlakuan sampel lidah buaya 400 $\mu\text{g/mL}$ (B), sel T47D setelah perlakuan sampel kulit batang kragean 100 $\mu\text{g/mL}$ (C), sel T47D setelah perlakuan sampel daun sembung 200 $\mu\text{g/mL}$ (D), sel T47D setelah perlakuan sampel biji kopi 400 $\mu\text{g/mL}$ (E).

Aktivitas sitotoksik sampel terhadap sel T47D diamati berdasarkan kematian sel setelah perlakuan sampel. Sel mati ditandai dengan inti sel yang menghitam dan mengecil. Morfologi sel T47D setelah perlakuan sampel tunggal ditampilkan pada Gambar 2. Kematian sel terlihat pada sampel lengkuas, daun sembung dan kulit batang kragean, sedangkan pada sampel lidah buaya dan biji kopi tidak terlihat adanya kematian sel hingga konsentrasi sampel tertinggi yaitu 400 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 3. Morfologi sel T47D diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x setelah perlakuan sampel kombinasi. Sel T47D setelah perlakuan lengkuas-lidah buaya 50 $\mu\text{g/mL}$ (A), sel T47D setelah perlakuan lengkuas-kulit batang kragean 50 $\mu\text{g/mL}$ (B), sel T47D setelah perlakuan lengkuas-daun sembung 50 $\mu\text{g/mL}$ (C), sel T47D setelah perlakuan lengkuas-biji kopi 50 $\mu\text{g/mL}$ (D).

Morfologi sel T47D setelah diberi perlakuan sampel kombinasi ditampilkan pada Gambar 3, kematian sel terlihat untuk semua sampel kombinasi pada konsentrasi 50 µg/mL. Nilai IC₅₀ tiap sampel dihitung berdasarkan log konsentrasi vs % sel hidup. Menurut *National Cancer Institute* (NCI) dan Geran *et al.*, (1972) didasarkan pada nilai IC₅₀ kategori aktivitas sitotoksik yaitu IC₅₀ ≤ 20 µg/mL = sangat kuat, IC₅₀ ≤ 21 - 200 µg/mL = moderat, IC₅₀ 201 - 500 µg/mL = lemah, dan IC₅₀ > 501 µg/mL = tidak aktif (Srisawat *et al.*, 2013).

Tabel 2. Hasil uji sitotoksik sampel tunggal pada sel T47D

Sampel	IC ₅₀ (1) (µg/mL) ± SD	IC ₅₀ (2) (µg/mL) ± SD	Rata-rata IC ₅₀ (µg/mL) ± SD	Kategori Aktivitas Sitotoksik
Lengkuas	54,85 ± 2,44	53,61 ± 5,38	53,73 ± 3,91	Moderat
Lidah buaya	> 500	> 500	> 500	Tidak aktif
Kulit batang kragean	115,65 ± 2,26	111,12 ± 2,22	113,38 ± 2,24	Moderat
Daun sembung	49,55 ± 0,50	68,60 ± 2,17	59,07 ± 1,33	Moderat
Biji kopi	> 500	> 500	> 500	Tidak aktif

Senyawa aktif utama pada laos yang memiliki aktivitas sitotoksik adalah *Acetoxy Chavicol Acetate* (ACA) dengan mekanisme meningkatkan apoptosis sel dan aktivasi *caspase-9* (Chouni *et al.*, 2018). *Acetoxy Chavicol Acetate* (ACA) merupakan golongan senyawa fenilpropanoid, sehingga senyawa tersebut dapat larut dalam pelarut semipolar seperti etil asetat. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Hidayati (2019) terkait aktivitas sitotoksik kandungan senyawa metabolit dari lengkuas pada sel T47D memperoleh nilai IC₅₀ sebesar 52,17 µg/mL, sedangkan pada penelitian ini diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 53,73 µg/mL. Hasil tersebut menunjukkan kemungkinan adanya senyawa *Acetoxy Chavicol Acetate* (ACA) yang terlarut dalam fraksi etil asetat laos yang digunakan pada uji sitotoksik.

Kandungan senyawa fenolat dalam lidah buaya memiliki aktivitas sitotoksik terhadap larva *Artemia salina*, senyawa fenolat larut dalam pelarut polar sehingga hasil penelitian menunjukkan fraksi air memiliki aktivitas yang lebih baik daripada fraksi etil asetat (Prahesti *et al.*, 2015). Nilai IC₅₀ fraksi etil asetat lidah buaya pada penelitian ini > 500 µg/mL, dapat terjadi karena senyawa fenolat lebih banyak terlarut dalam air dibandingkan dalam etil asetat saat dilakukan fraksinasi dan perbedaan metode pengujian aktivitas sitotoksik yang digunakan.

Kulit batang kragean mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, minyak volatile, dan steroid (Dalimunthe *et al.*, 2017). Penelitian sebelumnya IC₅₀ ekstrak etil asetat kulit batang kragean pada sel T47D sebesar 71,23 µg/mL, sedangkan pada penelitian yang dilakukan

nilai IC_{50} yang diperoleh adalah 113,38 $\mu\text{g/mL}$. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kulit batang krangan memiliki konsistensi aktivitas sitotoksik moderat terhadap sel T47D.

Daun banyak mengandung senyawa semipolar yang dapat larut dalam etil asetat seperti flavonoid (Saifudin, 2014). Fraksinasi daun sembung menggunakan etil asetat dapat mengisolasi sembilan senyawa flavonoid diantaranya yaitu dihidroflavonol, kuersetin, dan blumeatin. Senyawa Luteolin-7-metil eter memiliki nilai IC_{50} terendah pada sel NCI-H187 yaitu sebesar 5,21 $\mu\text{g/mL}$, namun senyawa tersebut tidak aktif terhadap sel MCF-7 (Saewan *et al.*, 2011). Nilai IC_{50} daun sembung pada penelitian ini yaitu 59,07 $\mu\text{g/mL}$ sehingga dapat dikatakan bahwa daun sembung memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel T47D.

Kopi banyak mengandung asam klorogenat (*5-O caffeoylquinic acid*) yang merupakan senyawa polifenol. Senyawa ini memiliki aktivitas antikanker pada sel MDA-MB-231 melalui penghambatan jalur fosforilasi/aktivasi MAP-Kinase p42/p44 dengan nilai IC_{50} 116,92 $\mu\text{g/mL}$ (Palmioli *et al.*, 2017). Penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa biji kopi tidak memiliki aktivitas sitotoksik pada sel T47D. Hal ini dapat disebabkan karena senyawa polifenol bersifat polar sehingga lebih banyak larut dalam air dibandingkan dalam etil asetat. Penyebab lainnya yaitu serbuk kopi yang digunakan untuk maserasi terlalu halus sehingga terjadi dispersi yang menyebabkan terganggunya proses difusi dan disolusi saat maserasi (Saifudin, 2014).

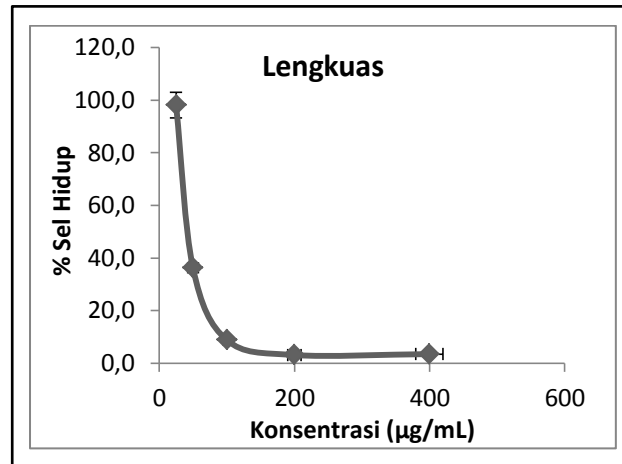
Tabel 3. Hasil uji sitotoksik sampel kombinasi pada sel T47D

Sampel	IC_{50} (1) ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD	IC_{50} (2) ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD	Rata-rata IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm SD	Kategori Aktivitas Sitotoksik
Lengkuas-lidah buaya	82,41 \pm 2,84	88,45 \pm 3,35	85,43 \pm 3,09	Moderat
Lengkuas-kulit batang krangan	81,10 \pm 2,56	76,13 \pm 2,84	78,77 \pm 2,70	Moderat
Lengkuas-daun sembung	76,57 \pm 1,55	72,95 \pm 1,44	74,76 \pm 1,49	Moderat
Lengkuas-biji kopi	103,10 \pm 3,48	106,1 \pm 2,67	104,63 \pm 3,07	Moderat

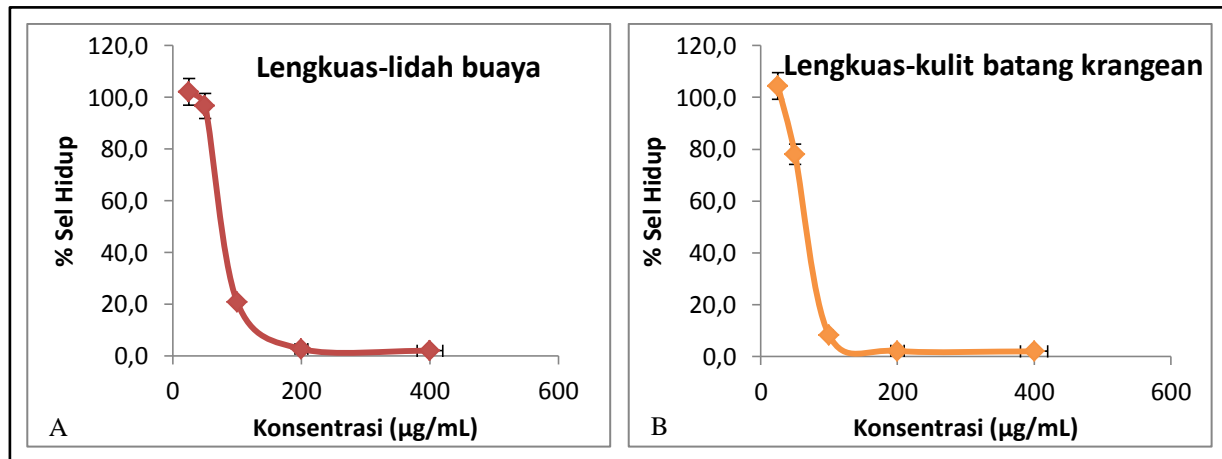
Efek sinergisme dari sampel lidah buaya, kulit batang krangan, daun sembung, dan biji kopi terhadap aktivitas sitotoksik lengkuas pada sel T47D dilihat berdasarkan nilai IC_{50} dan kategori aktivitas sitotoksik antara sampel lengkuas tunggal dan kombinasi. Kombinasi sampel dikatakan memiliki efek sinergisme apabila nilai IC_{50} sampel lengkuas kombinasi lebih rendah dan memiliki kategori aktivitas sitotoksik yang lebih kuat dibandingkan sampel lengkuas tunggal.

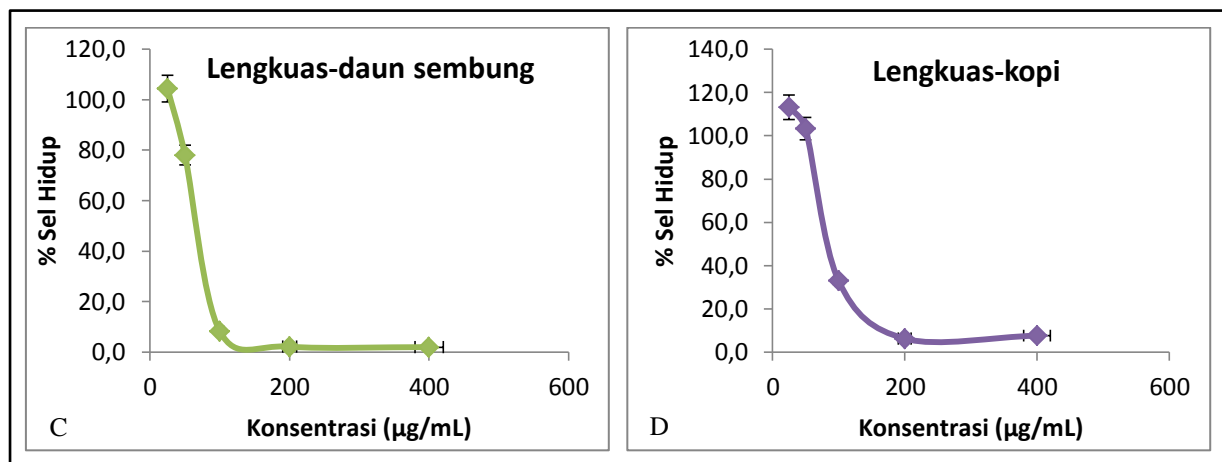
Berdasarkan hasil yang diperoleh diketahui bahwa sampel lidah buaya, kulit batang krangan, daun sembung, dan biji kopi tidak memiliki efek sinergisme terhadap aktivitas sitotoksik lengkuas pada sel T47D. Pada sampel kombinasi lengkuas-lidah buaya dan lengkuas-biji kopi, nilai IC_{50} yang diperoleh merupakan aktivitas sitotoksik dari sampel lengkuas. Selanjutnya, efek aditif

terjadi pada sampel kombinasi lengkuas-kulit batang kragean dan lengkuas-daun sembung. Efek aditif merupakan efek yang dihasilkan oleh senyawa A ditambah efek senyawa B (Borgert *et al.*, 2005), sehingga nilai IC₅₀ yang diperoleh merupakan penjumlahan aktivitas sitotoksik dari sampel lengkuas dan kulit batang kragean serta daun sembung.



Gambar 4. Pengaruh perlakuan sampel lengkuas tunggal uji sitotoksik MTT *assay* pada sel T47D.





Gambar 5. Pengaruh perlakuan sampel kombinasi uji sitotoksik MTT *assay* pada sel T47D. Sampel kombinasi lengkuas-lidah buaya (A), sampel kombinasi lengkuas-kulit batang krangan (B), sampel kombinasi lengkuas-daun sembung (C), sampel kombinasi lengkuas-kopi (D).

Pengaruh perlakuan sampel lengkuas tunggal dan kombinasi terhadap sel T47D ditampilkan pada Gambar 4 dan Gambar 5, terlihat % sel hidup menurun dengan meningkatnya konsentrasi sampel, sehingga dapat dikatakan bahwa kematian sel tergantung dari dosis sampel (*dose dependent response*). Pada sampel lengkuas tunggal mencapai % sel hidup $\leq 50\%$ hanya dibutuhkan konsentrasi sampel 50 µg/mL, sedangkan pada sampel kombinasi dibutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 100 µg/mL. Hal tersebut terjadi karena aktivitas sitotoksik sampel tunggal lidah buaya, kulit batang krangan, daun sembung dan biji kopi lebih lemah sehingga kombinasi lengkuas dengan keempat tanaman tersebut dapat menurunkan atau menghambat aktivitas sitotoksik lengkuas.

4. PENUTUP

Berdasarkan uji yang dilakukan disimpulkan bahwa fraksi etil asetat tanaman lidah buaya, kulit batang krangan, daun sembung, dan biji kopi tidak memiliki efek sinergisme terhadap aktivitas sitotoksik fraksi etil asetat lengkuas pada sel T47D. Efek aditif terjadi pada kombinasi lengkuas-kulit batang krangan dan lengkuas-daun sembung.

SARAN

Perlunya dilakukan perbandingan seri konsentrasi lengkuas:tanaman lain (1:5) agar dapat menghitung nilai *Combination Index* (CI), sehingga dapat diketahui secara pasti tingkatan efek sinergisme yang dihasilkan dari masing-masing kombinasi, dan perlu dilakukan standarisasi profil senyawa sehingga diperoleh kadar senyawa marker yang terkandung di dalam sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- ATCC, 2012, SOP: Thawing, Propagation, and Cryopreservation of T-47D, 133, 1–24.
- Aghaee, Fahimeh, Jalil Pirayesh Islamian, Behzad Baradaran, Asghar Mesbahi, Mohammad Mohammadzadeh, Mohammad Asghari Jafarabadi, 2013, Enhancing the Effects of Low Dose Doxorubicin Treatment by the Radiation in T47D and SKBR3 Breast Cancer Cells, *Journal of Breast Cancer*, 16 (2), 164–170.
- Anindyajati, Sarmoko, Dyaningtyas D. P. Putri, Adam Hermawan, and Edy Meiyanto, 2010, Combination of *Solanum nigrum* L. Herb Ethanolic Extract and Doxorubicin Performs Synergism on T47D Breast Cancer Cells, *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention* 1 (2), 78–84.
- Borgert, Christopher J., Susan A. Borgert, and Kathleen C. Findley, 2005, Synergism, antagonism, or additivity of dietary supplements: Application of theory to case studies, *Thrombosis Research* (2005) 117, 123—132.
- CCRC, 2009, Prosedur tetap Uji Sitotoksik Metode MTT, *Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta*, 6–9.
- Dalimunthe A., Hasibuan P.A.Z. and Satria D., 2017, Cell cycle arrest activity of Litsea cubeba lour: Heartwood and fruit extracts against T47D breast cancer cells, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10 (11), 24–26.
- Farhaty N. and Muchtaridi, 2014, Farmaka Farmaka, *Farmaka Suplemen*, 14 (1), 1–10.
- Fauzia, Anis, Umi Any Tiya Wati, Cahyaning Gita Rizkita, Eka Wahyuni Nurul, Qori'ah, and Ibrahim Arifin, 2017, The Effect of Marigold Leaves and Doxorubicin Toward Cell Cycle and Apoptosis of T47D Cells, *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 7 (3), 79–86.
- Hasegawa H., Yamada Y., Komiyama K., Hayashi M., Ishibashi M., Yoshida T., Sakai T., Koyano T., Kam T.-S., Murata K., Sugahara K., Tsuruda K., Akamatsu N., Tsukasaki K., Masuda M., Takasu N. and Kamihira S., 2006, Dihydroflavonol BB-1, an extract of natural plant *Blumea balsamifera*, abrogates TRAIL resistance in leukemia cells, *Blood*, 107 (2), 679–689.
- Heri W., Novitasari S.J., 2018, Rendemen Ekstrak Daun Rambai Laut, *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 4 (1), 79–83.
- Hidayati, Wahyu N, 2019, Pengaruh Variabilitas Kandungan Metabolit Lengkuas (*Alpinia Galanga*) Dari Jawa Tengah Dan Yogyakarta Terhadap Pertumbuhan Sel Kanker Payudara T47d Secara In Vitro, *Naskah Publikasi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Husni, Elidahanum, Faras Nahari, Yan Wirasti, Fatma Sri Wahyuni, Dachriyanus, 2015, Cytotoxicity study of ethanol extract of the stem bark of asam kandis (*Garcinia cowa* Roxb.) on T47D breast cancer cell line, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5 (3), 249–252.
- Jamalzadeh L., Ghafoori H., Sariri R., Rabuti H., Nasirzade J., Hasani H. and Aghamaali M.R., 2016, Cytotoxic Effects of Some Common Organic Solvents on MCF-7, RAW-264.7 and Human Umbilical Vein Endothelial Cells, *Avicenna Journal of Medical Biochemistry*, In press
- Kementrian Kesehatan RI, 2015, *Pusat Data dan Informasi*, Kementrian Kesehatan RI, Jakarta Selatan.
- Kementrian Kesehatan RI, 2015, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Kementrian Kesehatan RI, Jakarta.
- Ningsih, Indah Y., 2016, Studi Etnofarmasi Penggunaan Tumbuhan Obat Oleh Suku Tengger Di

Kabupaten Lumajang Dan Malang, Jawa Timur, *Pharmacy*, 13 (01), 10-20.

- Palmioli A., Ciaramelli C., Tisi R., Spinelli M., De Sanctis G., Sacco E. and Airoidi C., 2017, Natural Compounds in Cancer Prevention: Effects of Coffee Extracts and Their Main Polyphenolic Component, 5-O-Caffeoylquinic Acid, on Oncogenic Ras Proteins, *Chemistry - An Asian Journal*, 12 (18), 2457–2466.
- Prahesti N.R., Suzery M. and Cahyono B., 2015, The Antioxidant Activities, Phenolic Total and Cytotoxicity of Extract and Fractions of Aloe Vera Linn), *Jurnal Sains dan Matematika*, 23 (2), 50–54.
- Saewan, N., S., Koysomboon and K., Chantapromma., 2011, Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifera* DC, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (6), 1018–1025.
- Saifudin A., 2014, *Senyawa Alam Metabolit Sekunder*, Deepublish, Yogyakarta.
- Srisawat T., Chumkaew P., Heed-Chim W., Sukpondma Y. and Kanokwiroon K., 2013, Phytochemical screening and cytotoxicity of crude extracts of *Vatica diospyroides* Symington type LS, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (1), 71–76.
- Susan, 2009, Chemotherapy Side effects, *Health Communication Research Laboratory at Saint Louis University*
- Susidarti R.A., Jenie R.I., Ikawati M., Putri D.D.P. and Meiyanto E., 2014, Cytotoxic activity and apoptosis induction of 8-hydroxyisocapnolactone-2',3'-diol and its combination with Doxorubicin on MCF-7 and T47D cells, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4 (6), 089–097.
- World Health Organization, Traditional Medicine, 2013, Terdapat di: <https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/en/> [Diakses pada 25 April 2018].
- World Health Organization, 2014, Cancer Country Profiles, *Cancer Country Profiles*, 22–23.